

氏名	平田 浩二		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 10381 号		
学位授与年月	令和 4 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	レドックスナノ粒子とヒト歯髄由来神経系細胞による 虚血性脳卒中に対する再生医療の開発		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	家田 真樹
副査	筑波大学教授	博士（医学）	長谷川雄一
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	石井 一弘
副査	筑波大学助教	博士（理学）	山下 年晴

## 論文の内容の要旨

平田浩二氏の博士學位論文は、ヒト歯髄細胞から分化誘導した神経細胞をマウス脳梗塞モデルに移植する際に、新たな抗酸化剤であるレドックスナノ粒子を併用することの効果を検討したものである。著者は、低酸素培養や免疫染色を用いて、活性酸素種を消去することで移植環境の改善と移植細胞の生存率の向上を明らかにしている。その要旨は以下のとおりである。

### （目的）

虚血性脳卒中に対する細胞治療は発展途上であり、いくつかの臨床試験の結果が有用性を示しつつある。脳内への直接投与は、手術が必要であることから侵襲度が高いが、神経保護効果のみでなく、脳神経障害に対する根本的な治療方法である神経再生につながる可能性がある。脳梗塞急性期の細胞移植は、神経修復における可塑性および神経再生や神経新生に関与すると考えられているが、急性期の細胞投与には解決すべき問題点がある。その一つとして、脳梗塞周囲にはフリーラジカルの産生や炎症性サイトカイン・炎症細胞浸潤があり、低酸素環境であることから、移植細胞の生存率が低い。虚血性脳卒中急性期から亜急性期の移植環境は、移植細胞が生存・生着するには厳しい環境であるため、そのような細胞にとって非寛容な環境であっても移植細胞が生存・生着できる技術の開発が必要である。

著者は、新しい抗酸化剤として内部に TEMPO を含有したレドックスナノ粒子を細胞移植に併用することで移植環境を改善し、細胞の生存率を向上させることができるという仮説を立てた。そこで著者は、歯髄幹細胞から分化誘導した神経系細胞を用いて、低酸素培養実験やマウス脳梗塞モデルへの細胞移植にレドックスナノ粒子を併用した際の移植細胞の生存率や分化について解析を行うこととした。

### （対象と方法）

#### (1) 歯髄幹細胞、神経系細胞の誘導と評価

著者は、成人第 3 大臼歯から採取した歯髄を培養して歯髄幹細胞を得、それに神経分化誘導をかけることで神経系細胞を採取している。また免疫染色、PCR、フローサイトメトリー法を用いて歯髄幹細胞および神経系細胞の特性評価を行っている。

#### (2) In Vitro 実験

著者は、低酸素培養＋再灌流を行うことで活性酸素を発生させ、脳梗塞周囲領域の仮想モデルとして

いる。細胞生存アッセイ、アポトーシス評価、スーパーオキシドと炎症性サイトカイン発生評価を行うことでレドックスナノ粒子の効果を検討するとともに、電子スピン共鳴法と蛍光免疫染色を使用してレドックスナノ粒子の培養細胞での動態評価を行っている。

### (3) In Vivo 実験

著者は、遠位中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデルマウスの脳内に直接レドックスナノ粒子と神経系細胞を移植することで、移植細胞の生存率の評価と細胞の分化の評価を行い、また機能回復に関してはマウス行動評価を行い解析している。

## (結果)

### (1) 歯髄幹細胞、神経系細胞の誘導と評価

歯髄幹細胞では Doublecortin や MAP2 の発現は認められなかったが、分化誘導した神経系細胞には Doublecortin や MAP2 の発現が認められた。RT-PCR、リアルタイム PCR の結果から、神経系細胞には Doublecortin や MAP2 のみでなく、NESTIN、GFAP、Olig2 など他の神経系マーカー発現も歯髄幹細胞より上昇していることを著者は示している。フローサイトメトリーでは、神経細胞 8.37±0.59%、グリア細胞 58.4±2.6%が誘導されることを著者は確認している。

### (2) In Vitro 実験

レドックスナノ粒子を使用することにより、細胞の生存率の向上、アポトーシスの抑制、スーパーオキシドと炎症性サイトカインの発生の抑制が認められた。動態評価では、レドックスナノ粒子は細胞質内に認められ、酸化還元反応に寄与していた。

### (3) In Vivo 実験

レドックスナノ粒子は、スーパーオキシドを消去することで移植環境を改善した。またレドックスナノ粒子を併用することにより、移植 42 日後の移植細胞の生存率が向上した。生存した神経系細胞の多くはグリア細胞であったが、未熟・成熟神経細胞も含まれていた。一方で、マウス行動評価ではレドックスナノ粒子を細胞移植に併用することの効果は明らかでなかった。

## (考察)

本研究により、レドックスナノ粒子は活性酸素種を除去することで脳梗塞周囲巣の厳しい非寛容な移植環境を改善するとともに、移植細胞の生存率を向上させることが明らかになったと著者は考察している。そして、レドックスナノ粒子は、移植前の事前準備が必要なく、単に混合するのみで使用することができる簡便さがあることから、虚血性脳卒中の細胞治療に有用である可能性があることを著者は指摘している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

脳梗塞は大きな社会問題となっており、重い後遺症に悩む患者が多くいる現状において脳梗塞に対する再生医療が求められている。著者は、細胞実験や脳梗塞モデルマウスを用いて、レドックスナノ粒子は活性酸素種を除去することにより脳梗塞周囲巣の厳しい非寛容な移植環境を改善することを明らかにした。本研究成果は、新しい脳再生治療の実現に有益な知見をもたらすものである。

令和 4 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。